

**Versuche zur  
dünnschichtchromatographischen  
Trennung der Serumlipoide  
besonders der freien Fettsäuren**

Hassan Seyfzadeh

1961







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

AUS DER  
MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

---

**Versuche zur  
dünn-schicht-chromatographischen  
Trennung der Serumlipoide  
besonders der freien Fettsäuren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Hassan Seyfzadeh**  
aus Ahvaz (Iran)

München 1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|              |                          |
|--------------|--------------------------|
| Referent:    | Professor Dr. N. ZÖLLNER |
| Correferent: | Professor Dr. W. SEITZ   |
| Dekan:       | Professor Dr. W. SEITZ   |

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1961



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                | Seite |
|----------------------------------------------------------------|-------|
| Einleitung:                                                    | 5     |
| I. Methodik der Trennung der Serumlipoide                      | 6     |
| 1. Herstellung eines Serumlipoidextraktes:                     | 6     |
| 2. Herstellung der Adsorptionsschicht (Dünnschicht):           | 6     |
| 3. Vorbereitung der Chromatographiekammer:                     | 6     |
| 4. Entwicklung:                                                | 7     |
| 5. Trennung der Serumlipoide:                                  | 8     |
| 6. Färbemethoden zur Darstellung einzelner Lipide:             | 9     |
| a) Freies Cholesterin und Cholesterinester:                    | 9     |
| b) Freie Fettsäuren:                                           | 9     |
| c) Phosphorlipide und Neutralfette:                            | 10    |
| 7. Versuche zur Gewinnung einzelner Lipide:                    | 11    |
| a) Phosphorlipide:                                             | 11    |
| b) Cholesterinester und Neutralfette:                          | 11    |
| c) Trennung der Cholesterinester von Neutralfetten:            | 12    |
| d) Freie Fettsäuren und freies Cholesterin                     | 12    |
| II. Versuche zur Auftrennung der freien Fettsäuren             | 13    |
| 1. Papierchromatographie:                                      | 13    |
| 2. Dünnschichtchromatographie:                                 | 13    |
| 3. Verschiedene Modifikationen der Dünnschichtchromatographie: | 14    |
| a) Kombinierte Elutionsmittel:                                 | 14    |
| b) Zweidimensionale Chromatographie:                           | 16    |
| c) Trennung nach Vorbehandlung des Adsorbens:                  | 16    |
| Zusammenfassung:                                               | 18    |
| Literaturverzeichnis:                                          | 21    |



Die Trennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie ist ein neues chromatographisches Verfahren für analytische Untersuchungen auf dem Gebiet der Lipoidchemie. Sie stellt eine Ergänzung und Verfeinerung der bisher angewandten chromatographischen Methoden, wie etwa Säulen- und Papierchromatographie dar, unter denen sie nicht zuletzt auch als ein umfassendes Schnellverfahren besonders hervorragt. Das säulenchromatographische Verfahren (8) arbeitet langsam, so dass jede Untersuchung mit erheblichem Zeitaufwand verbunden ist; ausserdem sind die Anschaffungskosten der Apparatur sehr hoch. Mit der Papierchromatographie konnte bisher keine ausreichende Auftrennung aller Lipoidklassen voneinander erreicht werden; nur über die Trennung der Phosphorlipide liegen schon umfassende Mitteilungen vor (1). Infolgedessen ist es erwünscht, eine einfache Methode zur Hand zu haben, die in bedeutend kürzerer Zeit als die Säulenchromatographie eine ebenso exakte Trennung ermöglicht und präzise Angaben über die einzelnen Lipoidgruppen sowie qualitative und quantitative Aussagen gestattet.

Die Dünnschichtchromatographie benötigt sehr kurze Trennstrecken, wobei die Substanzen scharf begrenzt sind und mit grossem Abstand auseinander liegen. Das anorganische Adsorbens lässt sich sehr leicht von dem Träger (Platte) abkratzen und gestattet die Eluierung der abgetrennten Substanz mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels. Dabei werden die Lipide nicht verunreinigt, zerstört oder sonstwie für weitere Analysen unbrauchbar gemacht. Die Dünnschichtchromatographie ist nicht nur wegen ihrer Schnelligkeit, Sauberkeit und Genauigkeit vorteilhaft, sondern arbeitet auch mit kleinsten Mengen und hat daher einen äusserst geringen Bedarf an Untersuchungsmaterial. Diese Vorzüge lassen sie für die diagnostischen Arbeiten besonders geeignet erscheinen. Gelegentlich sind die abgetrennten Mengen für weitere Analysen allerdings zu klein.

Dünnschichtchromatographische Methoden der Lipoidchemie wurden bereits mehrfach mitgeteilt. H. WEICKER (7) berichtet über eine Differenzierung der Serumlipide, auf deren Basis die Methode von N. ZÖLLNER und Mitarbeitern (9) beruht, die eine ausreichende Trennung der Cholesterinester erlaubt. H. JATZKE-WITZ (2) berichtet über die Trennung und Identifizierung der Gehirnlipide. Gewisse Lipoidklassen sind mit den bisher angegebenen Methoden nicht zu trennen, z.B. die freien Fettsäuren von den Neutralfetten.

Die nachfolgende Methode besitzt nicht nur die Fähigkeit, die Serumlipide durch spezifische Farbreaktionen auf der Platte zu differenzieren, sondern alle Lipoidklassen des Plasmas in einer quantitativ auswertbaren Weise zu trennen.

# I. METHODIK DER TRENNUNG DER SERUMLIPOIDE

## 1. HERSTELLUNG EINES SERUMLIPOIDEXTRAKTES (4)

In einen mit 8,3 ml Methanol angefüllten 25 ml Messkolben wird 1 ml Serum tropfenweise einpipettiert. Es entsteht ein flockiger Niederschlag. Nach Zugabe von 9 ml Chloroform wird der Messkolben im Wasserbad bei etwa 70° C kurz aufgekocht und danach sofort unter fließendem Wasser abgekühlt. Der Inhalt wird nach vollständiger Abkühlung bis auf 25 ml mit Chloroform aufgefüllt; es wird filtriert und 20 ml werden in einen Schüttelzylinder übertragen. Es wird mit 4 ml einer 20 mg %igen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung überschichtet und nach Verschluss des Zylinders 2 - 3 Minuten kräftig geschüttelt. Nach 8 - 10 stündigem Stehen wird das Volumen der unteren Phase festgestellt; die obere Phase wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt; die untere Phase wird nun auf zwei Reagenzgläser verteilt. Jedes Reagenzglas enthält ca. 7 ml der Ausgangslösung mit einem Lipoidextrakt, der etwa 0,4 ml Serum entspricht. Das Chloroform wird im Wasserbad abgedampft, der Rückstand wird, je nach der Art der erforderlichen Analyse, in einem bestimmten Volumen Chloroform wieder aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgt nie trocken, sondern immer in Lösung.

## 2. HERSTELLUNG DER ADSORPTIONSSCHICHT (DÜNNSCHICHT)

Es wird bei diesen Versuchen auf quadratischen Glasplatten von 20 cm Kantenlänge gearbeitet. Zur Beschichtung von 5 solchen Platten werden 30 g Kieselgel G (E. MERCK), im Gegensatz zur Methode nach E. STAHL (5), nicht mit 60, sondern mit 65 ml dest. Wasser gemischt. Bezüglich der Auftragungstechnik und der allgemeinen Methodik der Dünnschichtchromatographie darf ich auf die Originalvorschriften nach STAHL verweisen. Die Abbindezeit beträgt hier ca. 2 Minuten. Während dieser Zeit muss unbedingt der Beschichtungsvorgang beendet sein. Es ist sehr empfehlenswert, die Platten für 6 - 8 Stunden nur an der Luft trocknen zu lassen, um einen allzu grossen Wasserverlust zu vermeiden. Nach dem Trocknen werden die Platten in der Richtung des Streichgerätes in 9 Bahnen mit je 2 cm Breite eingeteilt und in einem Spezialschrank aufbewahrt, um sie gegen Feuchtigkeit und Laborgase zu schützen.

## 3. VORBEREITUNG DER CHROMATOGRAPHIEKAMMER

Ein einwandfreies Chromatogramm setzt eine weitgehende Sättigung der Kammerluft mit dem zu verwendenden Lösungsmittel voraus. Daher muss auf guten Schluss der Kammer geachtet werden, da jede Entweichungsmöglichkeit eine inkonstante Kammersättigung als auch eine während des ganzen Chromatographievorganges sich fortsetzende Abdunstung des Elutionsmittels nach aussen hin zur Folge hat. Die fortlaufende Verdunstung macht sich bei der Trennung so bemerkbar, dass alle Substanzen sich über eine grössere Fläche ausdehnen, überlappen oder auch schräg wandern. Um möglichst ideale Sättigungsverhältnisse herbei-

zuföhren, wird die quaderförmige Glaskammer mit geschliffenem Glasdeckel bevorzugt. Die beiden Breitseiten der Kammerinnenwände werden mit gut saugfähigem Filtrierpapier behängt. Auf dem oberen Rand des Papiers wird eine Glasröhre angebunden, die jegliche Berührung der Adsorptionsschicht mit dem mit Elutionsmittel vollgetränkten Papier verhindert (Fig. 1).

Nachdem das Elutionsmittel in die Chromatographiekammer eingebracht und ein wenig geschüttelt wurde, wird der geschliffene Glasdeckel aufgesetzt und mittels eines Vakuumpfettes abgedichtet. Es muss dabei eine absolute Isolierung der Kammerluft von der Aussenluft zustandekommen. Die vollständige Raumsättigung der Kammer mit Elutionsmittel wird nach ca. 4 - 5 Stunden erreicht. In dieser Zeit ist eine Entwicklung zwar möglich, gibt aber keine befriedigenden Ergebnisse. Der Kammerboden muss etwa 0,5 cm mit Elutionsmittel bedeckt sein.

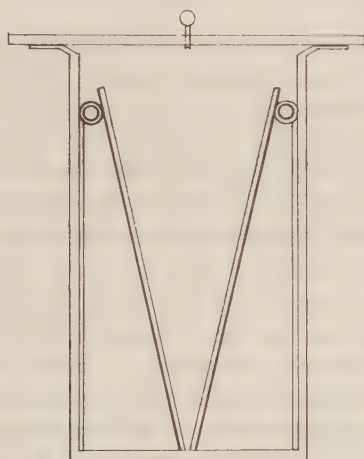


Fig. 1: Schnitt durch die  
Chromatographiekammer

#### 4. ENTWICKLUNG

Zum Einstellen der Platten ins Elutionsmittel wird der Deckel ganz kurz abgehoben, wobei die Platten in die Kammer eingestellt werden. Zur Entwicklung stellt man 1 oder 2 Platten, und zwar immer mit der Schicht zum Filtrierpapier zugewandt, in die vorher vorbereitete Kammer ein. Jede Änderung dieser Position hat eine ungleiche Wanderung der Substanzen bzw. einen schlechten Trenneffekt zur Folge. Nach der Wiederabdichtung des Deckels bleibt die Kammer während des ganzen Entwicklungsablaufs dicht verschlossen. Jede Temperaturschwankung, wie direkte Sonnenbestrahlung auf die Kammer, ist zu vermeiden, da sonst eine ungleichmässige Lösungsmittelfront zu erwarten ist. Falls sich doch eine ungleichmässige Front gebildet hat, muss die Herausnahme der Platten

aus der Kammer dann durchgeführt werden, wenn alle Bahnen den oberen Rand erreicht haben. Zur Vorbeugung jeglicher Überschreitung der einen oder anderen Bahn wird die obere Grenze des Chromatogramms durch einen Doppelstrich quer zu den Bahnen markiert, bis zu der das Elutionsmittel aufsteigen soll. Nach der Herausnahme der Platten wird die Kammer wieder sorgsam abgedichtet. So ist sie schon für die nächste Chromatographie vorbereitet.

## 5. TRENNUNG DER SERUMLIPOIDE

### Elutionsmittel:

Geeignetes Fliessmittel für die Trennung möglichst vieler Lipide in einem Arbeitsgang ist nach unserer Erfahrung eine Mischung von

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| Diisobutylketon (SCHUCHARDT) | 100,0 ml |
| Eisessig 99-100% (E. MERCK)  | 0,7 ml   |

Man trägt mittels einer Spezialpipette (auf 1  $\mu$ l graduiert) auf eine, wie beschrieben, vorbereitete Platte das Serumextrakt auf, so dass auf jede Bahn höchstens 1/10 der aus 1 ml Serum extrahierten Substanzmenge aufgetragen wird. Es ist dabei zu beachten, dass das Auftragen in kleinen nebeneinanderliegenden Punkten erfolgt, so dass ein schmaler Strich, nicht wie üblich ein Fleck, entsteht, und dass das Kieselgel vor erneutem Auftragen jeweils gut getrocknet ist. Damit erreicht man, dass die Substanz am Startpunkt auf einem kleinen Streifen zusammenbleibt; denn je schmaler der Substanzstreifen ist, um so schärfer wird der Trenneffekt. Auf jeder Seite bleibt ein 1 mm breiter Abstand zwischen der Bahnbegrenzung und der Substanz frei, um die etwaige Kapillarwirkung der Vertikalstriche und damit eine bogenförmige Wanderung zu vermeiden. Der Abstand zwischen Startpunkt und dem unteren Plattenrand beträgt 2,5 cm. Die Laufstrecke beträgt 14 cm. Sie wird wie besprochen durch die Markierungslinie quer zu den Bahnen gekennzeichnet und bestimmt den Endpunkt des Elutionsmittelaufstiegs. Die oberhalb der Grenzlinie liegende Fläche wird zur Markierung der Bahnen benutzt. Es ist ratsam, die erste und die letzte Bahn nicht zu benutzen, weil dort die Trenneffekte ungleichmässig sind. Gleich nach Beendigung des Auftragens wird die Platte in das Fliessmittel eingetaucht, weil manche Lipide (wie Phosphorlipide) eine Trockenheit für längere Zeit nicht vertragen können und beim langen Stehen der Platte an der Luft sich schnell verändern. Die Laufzeit beträgt ca. 2 Stunden.

Nach der Beendigung des Entwicklungsvorganges wird die Platte im Abzug ca. 6 Stunden an der Luft getrocknet.

Aus dem Serumextrakt werden durch diese Methode folgende Lipoidklassen auf der Platte getrennt:

1. Cholesterinester;
2. Neutralfette;
3. Freie Fettsäuren;
4. Freies Cholesterin;
5. Phosphorlipide.

Die Chromatogramme sind sehr gut reproduzierbar.

## 6. FÄRBEMETHODEN ZUR DARSTELLUNG EINZELNER LIPOIDE

### a) Freies Cholesterin und Cholesterinester

Zur Darstellung des freien Cholesterins und der Cholesterinester wird die Platte mit einer gesättigten (etwa 25%igen) Lösung Antimon-III-chlorid in Chloroform besprüht - für den Sprühvorgang ist nur der feinvernebelnde Sprüher mit Hilfe des  $N_2$ -Drucks einzusetzen - und ca. 5 Minuten bei 110 C° erhitzt. Das freie Cholesterin bzw. die Cholesterinester färben sich dabei mit einer rosaroten Farbe, die beim Stehen allmählich in eine violette und schliesslich in eine graue Farbe übergeht.

### b) Freie Fettsäuren

Zur Färbung der freien Fettsäuren wird die Platte mit Safraninreagens besprüht.

|                                                                            |         |
|----------------------------------------------------------------------------|---------|
| Kupfersulfatlösung (20%ig)                                                 | 25,0 ml |
| alkoholisches Phenol (2 Teile Phenol rein und<br>1 Teil absolutes Äthanol) | 1,0 ml  |

Die Mischung wird in einem Becherglas ca. 1 Minute über schwacher Flamme angewärmt bis die blaue Farbe des Kupfersulfats ganz klar erscheint. Nach dem Absetzen von dem Feuer werden folgende Reagentien noch hinzugefügt:

|                                                 |         |
|-------------------------------------------------|---------|
| Safraninlösung (20 mg% in destilliertem Wasser) | 2,5 ml  |
| Natriumfluoridlösung (4%ig)                     | 2,5 ml  |
| Destilliertes Wasser                            | 19,0 ml |

Nach dem Hinzufügen der zweiten Lösung bekommt die erste eine klare violette Farbe; das Gemisch ist ca. 48 Stunden haltbar. Während dieser Zeit ist die Flasche nach jedem Gebrauch wieder fest zu verschliessen. Nach 48 Stunden entsteht ein feiner Niederschlag. Die Lösung kann durch Abfiltrieren des Niederschlages für weitere 48 Stunden gebrauchsfähig gemacht werden. Durch das Besprühen der Platte mit dem Safraninreagens erscheinen die freien Fettsäuren als blaue Flecken. Der Hintergrund wird rosa gefärbt. Die anderen Lipide bleiben dagegen ungefärbt. Die Färbemethode ist für die freien Fettsäuren spezifisch. Die blaue Farbe verschwindet aber wieder nach 30 Minuten, wenn die Platte an die Luft gestellt wird. Sie verschwindet auch sofort bei Erwärmung der Platte. Eine Wiedersichtbarmachung ist nur nach einem abermaligen Besprühen möglich. Sollte aus technischen Gründen eine Sichtbarhaltung der Farbe erwünscht sein, wird die Platte ca. 5 Minuten nach dem Besprühen - zwecks Abtrocknen der Reagensfeuchtigkeit - mit einer zweiten unbeschichteten Platte verdeckt und mit Leucoplast an ihr befestigt. Die untere Nachweisgrenze für die freien Fettsäuren beträgt unmittelbar nach der Auftragung ca. 20 γ, nach der Entwicklung dagegen 100 γ, weil das Elutionsmittel die Darstellung der Fettsäuren hemmend beeinflusst.

### c) Phosphorlipoide und Neutralfette

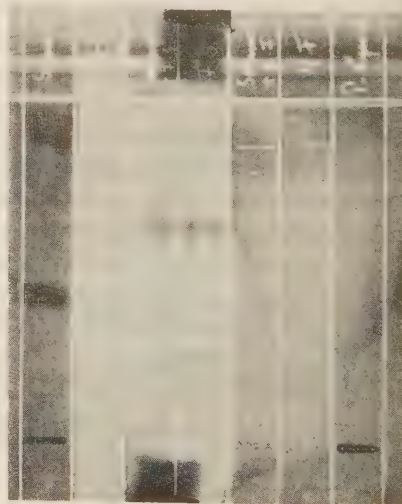
Die Platte wird zuerst mit einer 5%igen wässrigen Jodkalilösung besprüht und bleibt bis zum vollständigen Abtrocknen (ca. 10-15 Minuten) im Abzug stehen. Nach dem Abtrocknen wird sie mit dem Safraninreagens übersprüht. Es ist keine Wärmeanwendung notwendig. Die Farbe erscheint nämlich sofort nach dem Besprühen. Die Phosphorlipoide färben sich dabei als braune und die Neutralfette als orangefarbene Flecken an. Der Hintergrund wird gelb gefärbt. Die freien Fettsäuren sind grün und das freie Cholesterin bzw. Cholesterinester erscheinen als schwach gelb gefärbte Flecken. Die Spezifität der Färbemethode ist für die Phosphorlipoide ausgezeichnet. Es muss auch hier wieder betont werden, dass die Erhaltung der Farben wie bei freien Fettsäuren eine Abdeckung der Platte benötigt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei Phosphorlipoiden bei ca. 20  $\gamma$ , bei Neutralfetten dagegen bei ca. 80  $\gamma$ .

Es ist möglich, auf einer Platte alle Färbungen zur Darstellung aller Lipide durchzuführen. Dazu müssen die Färbevorgänge in bestimmter Reihenfolge durchgeführt werden.

Zum Auftragen wird je nach der Zahl der für die Färbung vorgesehenen Substanzen das gleiche Lipoidgemisch auf mehrere Bahnen aufgetragen und parallel entwickelt. Für die Darstellung der freien Fettsäuren ist eine dem Lipoidgemisch zugefügte Fettsäuremenge erforderlich, da, wie beschrieben, das Elutionsmittel den geringen Fettsäuregehalt des Serums nicht zur Darstellung kommen lässt. Das Chromatogramm wird wie beschrieben entwickelt. Zunächst werden das freie Cholesterin und die Cholesterinester gefärbt, wobei die übrigen Bahnen mit einer zweiten Platte gut abgedeckt werden. Nach dem Erhitzen lässt sich die Platte nur nach vollständiger Abkühlung wieder zur Darstellung anderer Substanzen anfärben. Die zum Phosphorlipoid- bzw. Neutralfettnachweis vorgesehenen Bahnen werden wieder nach der Bedeckung anderer Bahnen besprüht. Am Schluss färbt man die freien Fettsäuren (Fig. 2).

Fig. 2:

- Bahn 1: Freies Cholesterin und Cholesterinester
- Bahn 2: bleibt frei
- Bahn 3+4: Freie Fettsäuren
- Bahn 5+6: Neutralfette
- Bahn 7: Phosphorlipoide



Die RF-Werte liegen für einzelne Lipide folgendermassen:

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Cholesterinester:   | 0,923 |
| Neutralfette:       | 0,907 |
| freie Fettsäuren:   | 0,677 |
| freies Cholesterin: | 0,5   |
| Phosphorlipide:     | 0     |

## 7. VERSUCHE ZUR GEWINNUNG EINZELNER LIPOIDE

Der aus 1 ml Serum gewonnene Lipoidextrakt wird auf eine Bahn mit 9 cm Breite aufgetragen. Die übrigen Bahnen werden als Testbahn für die verschiedenen Färbungen benützt (siehe Fig. 4 Seite 13).

### a) Phosphorlipide

Die Phosphorlipide sind sehr instabil und verändern sich bereits an der Luft, wodurch dunkle, übelriechende Substanzen entstehen. Dieselben Veränderungen treten beim Erhitzen über  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  und ausserdem auch bei Anwesenheit von Säuren auf. Infolgedessen ist es sehr empfehlenswert, die Phosphorlipide auf Platten abzutrennen, auf denen die scharfe Trennung der übrigen Lipide nicht erzielt werden muss. So sollte man zur Abtrennung der Phosphorlipide nur reines Diisobutylketon als Elutionsmittel verwenden, eine Zugabe von Eisessig kann fehl am Platze sein. Die Spuren von Eisessig, die diesem Chromatographiesystem normalerweise zugesetzt werden, sind für das Zusammenbleiben der freien Fettsäuren unentbehrlich; (siehe später!) dies braucht aber die Gewinnung der Phosphorlipide nicht zu stören, wenn man die freien Fettsäuren nicht gleichzeitig gewinnen will. Eine Färbung, die eventuell eine Veränderung des Moleküls verursacht, erübrigt sich, weil die Phosphorlipide am Startpunkt zurückbleiben und sich bei der Entwicklung nicht bewegen. Es genügt, den Startpunkt mit einem scharfen Spatel abzukratzen und das phosphorlipoidhaltige Kieselgel in Chloroform bzw. Petroläther ( $\text{Kp. } 40 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) aufzunehmen. Das Kieselgel wird dann abzentrifugiert. Sollen die Phosphorlipide quantitativ gewonnen werden, so ist das Kieselgel mehrfach mit dem Lösungsmittel zu waschen und wieder abzuzentrifugieren.

### b) Cholesterinester und Neutralfette

Das Elutionsmittel ist bei diesem Versuch wieder das reine Diisobutylketon ohne Zugabe von Eisessig.

Da eine Eluierung der Cholesterinester bzw. der auf annähernd gleichem Niveau sich befindlichen Neutralfette ohne Färbung nicht möglich ist, werden auf der Platte zwei Bahnen für die Darstellung der Cholesterinester und der freien Fettsäuren vorgesehen. Als Standardsubstanz für die Cholesterinester verwendet man den Serumextrakt, aus dem die Ester extrahiert werden sollen. Da-

gegen ist als Testsubstanz für die freien Fettsäuren eine Mischung von verschiedenen Fettsäuren (wie z.B. Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Linol- oder Ölsäure) geeignet, wovon ca. 200γ zum sicheren Nachweis aufgetragen werden. Die oberhalb der freien Cholesterin- bzw. Fettsäureflecken liegende Fläche wird - weil die freien Fettsäuren in reinem Diisobutylketon annähernd mit freiem Cholesterin wandern - abgekratzt und in Chloroform aufgenommen. Das Kieselgel wird, wie oben beschrieben, abzentrifugiert. Die Lösung wird im Wasserbad bis zur Trockne eingedampft und in 0,4 ml Chloroform wieder aufgenommen.

### c) Trennung der Cholesterinester von Neutralfetten

Die Cholesterinester-Neutralfettmischung wird auf eine neue Platte aufgetragen (auf jede Bahn 1/20 der Mischung) und in einem zweiten System entwickelt.

Als Elutionsmitte' hat sich eine Mischung von 1 % Isopropyläther (E. MERCK) in Benzinum Petrolei (Kp. 40 - 70 C°) sehr gut bewährt. Für die vollkommene Trennung muss die Platte 3 - 4mal nacheinander entwickelt werden. Fünf Cholesterinester werden mit ausreichendem Abstand voneinander bzw. von den beigemengten Neutralfetten getrennt (Fig. 3).

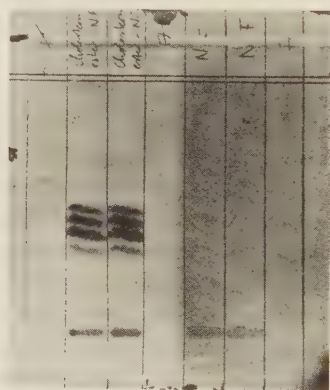


Fig. 3

### d) Freie Fettsäuren und freies Cholesterin

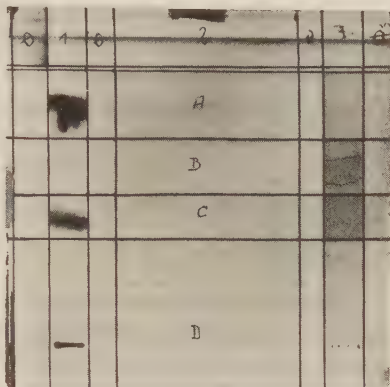
Die Zugabe von Eisessig ist speziell für die Gewinnung der freien Fettsäuren und des Cholesterins notwendig; denn es hat sich wiederholt gezeigt, dass die langkettigen Fettsäuren sich ohne die Anwesenheit von einigen Tropfen Eisessig ausdehnen. Das Elutionsmittel ist also dementsprechend:

|                    |          |
|--------------------|----------|
| Diisobutylketon    | 100,0 ml |
| Eisessig (99-100%) | 0,7 ml   |

Für die Lokalisation des Cholesterins bzw. der Fettsäuren sind wiederum zwei Standardbahnen nötig. Die Gewinnung erfolgt wie bei den anderen Substanzen (Fig. 4).

Fig. 4:

- Bahn 1: Testbahn für die Identifizierung des freien Cholesterins bzw. der Cholesterinester  
 Bahn 2: Serumextrakt zur Gewinnung der Lipide  
 Bahn 3: Testbahn für die Identifizierung der freien Fettsäuren  
 Fläche A: Cholesterinester und Neutralfette  
 Fläche B: Freie Fettsäuren  
 Fläche C: Freies Cholesterin  
 Fläche D: Phosphorlipide



## II. VERSUCHE ZUR AUFTRENNUNG DER FREIEN FETTSÄUREN

### 1. PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Die mittels Dünnschichtchromatographie aus 1 ml Serum abgetrennten Fettsäuren werden auf ein mit Paraffin (10 % Paraffin liq. in Benzin) imprägniertes Papier (2043 bmgI SCHLEICHER u. SCHÜLL) aufgetragen. Das Chromatogramm wird mit einer 92 %igen wässrigen Eisessiglösung entwickelt (3) und nach der Entwicklung gefärbt (6). Nach der Färbung erscheinen die Fettsäuren als vier fast ineinander übergehende Flecken. Der obere Fleck entspricht dem Linol, der untere der Stearinsäure. Nach Hydrierung, also Aufhebung der Doppelbindungen gehen alle in Palmitin- bzw. Stearinsäure über, die als zwei scharf getrennte Flecken sichtbar werden. Um die Palmitin- bzw. Stearinsäureflecken scharf zu bekommen, darf nur das Fettsäurematerial aus 0,25 ml Serum nach der Hydrierung auf das Papier aufgetragen werden. Alle ungesättigten Fettsäuren gehen, soweit dies in mehreren Chromatogrammen zu sehen war, beim Hydrierungsvorgang in Palmitin- bzw. Stearinsäure über.

### 2. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

In vielen Versuchen zum Zwecke der Trennung der freien Fettsäuren auf der Kieselgelplatte liessen sich die Fettsäuren nicht ganz einwandfrei voneinander trennen. Einige der verwendeten Fliessmittel vermochten zwar die Fettsäuren in Bewegung zu setzen, führten jedoch zu Überlappung bzw. gleichmässiger Wande-

rung aller Substanzen, so dass eine Trennung nur unvollkommen oder gar nicht erreicht werden konnte. Auch verschiedene Modifikationen des Adsorbens, wie etwa Zugabe einer Base, einer Säure bzw. eines Puffers hatten keinen wesentlichen Einfluss auf den Trenneffekt, so dass man die Wahrscheinlichkeit einer vollkommenen Trennung der Fettsäuren als sehr gering annehmen muss, was aus den Ergebnissen vieler auf diesem Gebiet durchgeführten Versuche zu ersehen ist. Zur Darstellung der freien Fettsäuren auf der Platte wird das beschriebene Safraninreagens verwandt. Gerade zu diesen Fragen wurden sehr viele Versuche unternommen. Statt Protokollen zeigt die folgende Tabelle die Ergebnisse (siehe Seite 15).

### 3. VERSCHIEDENE MODIFIKATIONEN DER DÜNNESCHICHTCHROMATOGRAPHIE

#### a) Kombinierte Elutionsmittel

Da manche Fliessmittel nicht imstande sind, die Fettsäuren in Bewegung zu setzen, wie man aus der oben angeführten Tabelle ersehen kann, ist auch die Anwendung einer Kombination dieser Lösungsmittel für die Auftrennung sinnlos und führt zu keinem Ergebnis. Eine Mischung ist dann angebracht, wenn man ein für die Mobilität der Fettsäuren hochaktives und ein für die Fettsäuretrennung indifferentes Lösungsmittel, das vielleicht sogar die mobile Phase hemmt, zur Verfügung hat. Deshalb wurden verschiedenartige Elutionsmittel in wechselnden Mischungsverhältnissen durchgeprüft, wobei relativ gute Trennergebnisse erreicht wurden. An dieser Stelle seien einige Beispiele erwähnt:

aa) Die Platten werden wie üblich vorbereitet.

Zum Auftragen benützt man eine Fettsäure-Chloroformlösung, von der auf jede Bahn höchstens 100  $\gamma$  jeder Fettsäure aufgetragen werden.

Als Elutionsmittel verwendet man eine Mischung von Benzinum Petrolei (Kp. 40 - 70), n-Butanol und Eisessig im Verhältnis 9 : 0,6 : 0,2, (evtl. 0,4). Die Färbung wird wie beschrieben durchgeführt.

Mit diesem Versuch ist eine gewisse Trennung möglich, weil die Zugabe von etwas Eisessig die Fettsäuren in Bewegung zu setzen vermag und ihre Ausdehnung verhindert, sogar eine geringfügige Trennung ermöglicht. Die Rf-Werte der  $C_{18}$ - und  $C_{16}$ -Säuren liegen auf dem Chromatogramm höher als  $C_{14}$ -Säure, d.h. die  $C_{18}$ -Säure läuft schneller als die  $C_{14}$ -Säure. Durch diese Mischung ist eine vollständige Trennung der Laurin-, bzw. Linolsäure von Stearin- und Palmitinsäure möglich.

bb) Als Elutionsmittel benützt man eine Mischung von Benzinum Petrolei (Kp. 40 - 70), Benzol, Äthanol und Diäthyläther im Verhältnis 10 : 2 : 1 : 0,4.

Das Ergebnis ist dem des vorherigen Versuches gleich, mit dem Unterschied, dass hierbei die Rf-Werte umgekehrt liegen, d.h., dass die  $C_{14}$ -Säure schneller läuft als die  $C_{18}$ -Säure.

| Fließmittel                 | Keine Wanderung | Ausdehnung aller Fettsäuren | Wanderung mit Ausdehnung langkettiger Fettsäuren | Wanderung mit Überlappung | Wanderung mit der Front | unvollständige Trennung |
|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Aceton                      | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Ameisensäure                |                 |                             |                                                  | +                         | +                       | +                       |
| Anisol                      | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| Äthanol                     | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Äthylacetat                 | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Äthylmethylketon            |                 |                             | +                                                | +                         |                         |                         |
| Benzinum Petrolei (Kp. 150) | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| Benzin                      | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| Benzol                      | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| n-Butanol                   | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Tertiär-Butanol             |                 |                             |                                                  | +                         |                         | +                       |
| n-Butyläther                |                 | +                           |                                                  | +                         |                         |                         |
| Chloroform                  | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Collidin                    | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| Diäthyläther                | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Diisobutylketon             |                 |                             | +                                                | +                         |                         |                         |
| Dioxan                      | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| Eisessig                    |                 |                             |                                                  | +                         | +                       | +                       |
| n-Heptan                    | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| Isopropylalkohol            |                 | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Isopropyläther              |                 | +                           |                                                  | +                         |                         |                         |
| Methanol                    | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Methylchlorid               |                 | +                           | +                                                |                           |                         |                         |
| Iso-Octan                   | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| n-Propylalkohol             | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| n-Propyläther               |                 | +                           |                                                  | +                         |                         |                         |
| Pyridin                     | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |
| Tetrachlorkohlenstoff       | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Tetrahydrofuran             |                 |                             | +                                                | +                         |                         |                         |
| Toluol                      | +               | +                           |                                                  |                           |                         |                         |
| Wasser                      | +               |                             |                                                  |                           |                         |                         |

Als Zusatzmittel wurden folgende Substanzen den oben angeführten Lösungsmitteln zugefügt:

Ammoniak (wässrig)  
 Borsäure  
 Citronensäure  
 Kalilauge  
 Natronlauge  
 Salicylsäure  
 Schwefelsäure  
 Trichloressigsäure

## b) Zweidimensionale Chromatographie

Wie angedeutet, liegen die Rf-Werte beim Versuch (bb) im Vergleich zu dem Versuch (aa) genau umgekehrt. Von dieser Überlegung ausgehend kann durch eine zweidimensionale Entwicklung, nämlich eine Kombination beider Versuche in zwei entgegengesetzten Richtungen eine schärfere Trennung erzielt werden.

### Durchführung:

#### Chromatogramm

Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen wird die Platte nur mit Vertikalstrichen versehen. Die Chromatogrammgrenze darf also hier nicht durch den Querstrich markiert werden.

#### Auftragen

Die Fettsäuren werden in 10 cm Höhe vom unteren Plattenrand - etwa in der Mitte der Bahn - wie beschrieben aufgetragen. Hier sei besonders auf die strichweise Auftragung hingewiesen. Jedes Zerkratzen des Kieselgels ist unbedingt zu vermeiden.

#### Entwicklung

Zur Entwicklung benötigt man zwei Chromatographiekammern. Zunächst wird die Platte in dem bei Versuch (bb) schon beschriebenen Fließmittel zweimal hintereinander entwickelt. Nach dem ersten Entwicklungsvorgang und fünfminütigem Stehen an der Luft wird sie um 180° gedreht und im zweiten Elutionsmittel wieder entwickelt (siehe Versuch aa), so dass die zweite Fließrichtung der ersten entgegengesetzt ist. Die Fettsäuren werden dann gefärbt. Die Trenneffekte sind fast vollständig.

## c) Trennung nach Vorbehandlung des Adsorbens

aa) Eine Imprägnierung der Platte mit 10 % Paraffin in Benzinum Petrolei (analog zur oben beschriebenen Papierchromatographie). Entwicklung in 92 - 99 % Eisenessig hat sich als ungeeignet erwiesen.

#### bb) Imprägnierung mit 99 - 100 % Eisessig

Die Platte wird vor dem Auftragen mit Eisessig bis zum oberen Rand imprägniert. Nach dem Trocknen an der Luft wird die Substanz aufgetragen und in einer Mischung von Benzinum Petrolei (Kp. 40 - 70) Äthanol und Diäthyläther 9,5 : 0,4 - 0,5 : 0,2 entwickelt. Nach der Entwicklung wird die Platte 15 Minuten bei 120 C° erhitzt und nach Abkühlung gefärbt. Der Trenneffekt ist fast vollständig.

#### cc) saures Adsorbens

Mischung des Kieselgels mit 60 ml 1 - 10 % Eisessig  
Elutionsmittel: 1 - 3 % Äthanol in Tetrachlorkohlenstoff  
Trenneffekt: Unvollständig

dd) alkalisches Adsorbens

Mischung des Kieselgels mit 65 ml 0,1 - 1 n NaOH

Elutionsmittel: 95 - 100 % Eisessig

Trenneffekt: Unvollständig

ee) gepuffertes Adsorbens

Mischung des Kieselgels mit 60 ml Acetat-Puffer (PH 3,7 - 4,3)

Elutionsmittel: Eine Mischung von Benzinum Petrolei, n-Butanol und Eisessig 9,3 : 0,5 : 0,2

Trenneffekt: Unvollständig

ff) wasserfreies (aktives) Adsorbens

Mischung des Kieselgels mit 65 ml n-Butanol

Elutionsmittel: 80 - 99 % Eisessig

Trenneffekt: Unvollständig

gg) Adsorbens mit  $\text{CaCl}_2$

Mischung des Kieselgels mit 65 ml einer 5 %igen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung

Elutionsmittel: 0,5 - 4 % Eisessig in Diisobutylketon

Trenneffekt: Unvollständig

hh) absteigende Chromatographie

a) als Sättigungsmittel: 2 % Eisessig in Diisobutylketon

b) als Elutionsmittel: reines Diisobutylketon

Trenneffekt: Unvollständig

ii) Adsorbens mit Borsäure

Mischung des Kieselgels mit 65 ml 4 % Borsäurelösung

Elutionsmittel: 5 - 20 % Äthylmethylketon bzw. Isopropylketon in Benzinum Petrolei (Kp. 70); eventuell mehrmalige Entwicklung im gleichen Lösungsmittel.

Trenneffekt: Weitgehend vollständig mit geringer Überlappung der Palmitin- und Stearinsäure.

Mit Hilfe dieses Systems kann eine ausreichende Trennung der Laurin- und Linolsäure erreicht werden.

## I. SERUMLIPOIDE

### 1. Lösungsmittel

Die Serumlipide werden durch Entwicklung der Platte in einer Mischung von Diisobutylketon und Eisessig im Verhältnis 10 : 0,07 getrennt. Das reine Diisobutylketon vermag zwar die Lipide - ausser Phosphorlipide, die an der Auftragsstelle zurückbleiben - in Bewegung zu setzen, gestattet jedoch nicht die ausreichende Trennung anderer Lipidklassen: Die freien Fettsäuren überlappen das freie Cholesterin und die Neutralfette die Cholesterinester. Dieser Mangel an Trennung wird für die freien Fettsäuren durch eine geringe Zugabe von Eisessig vollkommen behoben, so dass ein für die Isolierung ausreichender Abstand zwischen ihnen und dem Cholesterin entsteht. Ein zweites Chromatographiesystem, in welches das eluierte Gemisch aus Cholesterinester und Neutralfetten zugesetzt wird, erlaubt die exakte Trennung der Cholesterinester voneinander; gleichzeitig bleiben die Neutralfette fast am Auftragsort zurück. Das dazu geeignete Lösungsmittel ist nach unserer Erfahrung 1 % Isopropyläther in Benzinum Petrolei (Kp. 70), mit der wiederholten Entwicklung des Chromatogramms mit dem gleichen Lösungsmittel.

### 2. Färbemethoden

#### a) Fettsäuren

Die Darstellung der freien Fettsäuren erfolgt mit Hilfe des Safraninreagens. Die Farbreaktion beruht nach unserer Ansicht auf einer Komplexbildung der Fettsäuren mit Kupfer, wobei das Safranin und Phenol als saure Agentien die Hintergrundfarbe darstellen bzw. die Farbintensität beeinflussen, was für die langkettigen Fettsäuren ( $C_{16}$ -,  $C_{18}$ -Säuren) von grosser Wichtigkeit ist.

Weiterhin setzt das Natriumfluorid durch Bindung des Safranins die intensive Farbe dieses Farbstoffes herab und verhindert dadurch die übermässige Rotfärbung des Hintergrundes.

#### b) Phosphorlipide

Die Farbreaktion ist bedingt durch die Komplexbildung des Phosphorlipoides mit Jod, welches nach Einwirkung des Kupfersulfat-Phenol-Gemisches (Safraninreagens) in Freiheit gesetzt wird.

## II. FREIE FETTSÄUREN

Die schwierige Auftrennung der Palmitin- von der Stearinsäure war der Anlass, verschiedene Chromatographiesysteme zu entwickeln. Hier werden nur die empfohlen, die eine weitgehende Trennung beider Fettsäuren ermöglichen. Es sind die zweidimensionale Chromatographie (Versuch b S. 16) und der Zusatz von Borsäure zum Adsorbens (Versuch ii S. 17). Durch Zugabe der Borsäure zu dem

Kieselgel wird versucht, die Aktivität des Adsorbens zu verringern und die dadurch bedingte Mobilitätshemmung der  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ -Säuren zu beseitigen.

An dieser Stelle möchte ich Herrn  
Professor Dr. N. ZÖLLNER meinen Dank  
für die Überlassung der Arbeit, die  
freundliche Betreuung sowie die Über-  
nahme des Referates aussprechen.

# LITERATURVERZEICHNIS

1. HÖRHAMMER L., H. WAGNER, und G. RICHTER:  
Biochem. Zschr. 331 (1959), 155
2. JATZKEWITZ, H.:  
Hoppe Seyler's Zschr. physiol. Chem. 320,  
(1960), 251
3. KAUFMANN, H. und W. NITSCH:  
Fette und Seifen 56, (1954), 145
4. SPERRY, W.M.:  
Lipide Analysis Vol. 2, p. 83  
New York/London: Interscience Publishers 1955
5. STAHL, E.:  
a) Pharmac. Weekbl. 92 (1957), 829  
b) Chemiker Ztg. 82, (1958), 323  
c) Parfümerie und Kosmetik 39, (1958) 564  
d) Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.  
292/64 (1959), 411
6. WAGNER, H. und L. ABISCH:  
Helvet. chimica acta 38/2, (1955), 1536
7. WEICKER, H.:  
Klin. Wschr. 37, (1959), 767
8. ZÖLLNER, N. und K. KIRSCH:  
Zschr. exper. Med. 134, (1960), 10
9. ZÖLLNER, N., K. KIRSCH und G. AMIN:  
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 66, (1960), 677

## L E B E N S L A U F

Am 15. Oktober 1933 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Mehdi Seyfzadeh und seiner Ehefrau Schams in Ahvaz/Iran geboren. Nach der Absolvierung der Volksschule besuchte ich im Herbst 1946 die Oberschule "Adab" in Esfahan, die ich 1952 nach bestandenem Abitur verliess. Im Sommer 1953 legte ich dann am Gymnasium "Hatef" das naturwissenschaftliche Fachabitur ab. Nach dreijähriger Unterbrechung begann ich im Sommer 1956 das Medizinstudium an der Universität München. Im Sommer 1958 bestand ich hier die ärztliche Vorprüfung. Die folgenden Semester studierte ich ebenfalls in München. Am 13. Dezember 1961 legte ich hier das medizinische Staatsexamen ab.







